Das Verhalten von Enterovirus-Antigenen im Zellulose-Ionenaustauscher

von

Willi Barthel Hillebrand

1979

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0089

Aus dem Insitut für Medizinische Mikrobiologie

und Virologie der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. P. Naumann

Das Verhalten von Enterovirus-Antigenen im Zellulose-Ionenaustauscher

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Willi Barthel Hillebrand

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.:
Prof. Dr. Krüskemper

Referent
gez.: Prof.Dr.W.A.K. Schmidt

Korreferent
gez.:
Prof.Dr. Müntefering

Meinen Eltern und Kindern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 3

Thematik 5

Material und Methoden 6
1. Virusvermehrung und Antigengewinnung 6
a. Virusstämme 6
b. Zellkultur 6
c. Gewinnung des Rohantigens 6
d. Herstellung der Testantigene 6
2. Virusausfällung durch Entsalzung 7
a. Entsalzung mit Hilfe von Ionenaustauschern 7
b. Entsalzung durch Schlauchdialyse 8
3. Virusfällung mit Hilfe von Polyphosphaten 8
4. Viruskonzentration durch Ultrazentrifugation 9
5. Viruskonzentration durch Evaporation 10
6. Trennung von Viruskomponenten durch Säulenchromatographie 10
7. Komplementbindungsreaktion (KBR) 11
a. KBR nach SCHMIDT und LENNETTE 11
b. KBR nach FULTON und DUMBELL 11
8. Infektiositätsbestimmung 12

Versuchsergebnisse 14
1. Konzentrierung mit Hilfe von Ionenaustauschern 14
a. Coxsackievirus Typ B5 14
b. Echovirus Typ 9 14
2. Konzentrierung mittels Schlauchdialyse 14
3. Mehrschrittverfahren zur Viruskonzentration 17
a. Polyphosphatfällung, Butanolextraktion, Ultrazentrifugation 17
b. Polyphosphatfällung, Ultrazentrifugation 17
4. Säulenchromatographie von Poliomyelitisvirus Typ 1 20
5. Säulenchromatographie von Coxsackievirus Typ A9 25

6. Säulenchromatographie von Coxsackievirus Typ B5 26
7. Säulenchromatographie von Echovirus Typ 9 29

Diskussion 31

Zusammenfassung 36

Literatur 37

Danksagung 40

Lebenslauf 41

Einleitung

In der Virologie haben wir es vielfach noch mit Modellvorstellungen zu tun. Bei den Enteroviren gilt das Poliomyelitisvirus mit seinen drei Typen als Modellvirus. Die Grenze zwischen allgemeinen und besonderen Eigenschaften ist daher fließend und dem Widerstreit der Meinungen unterworfen.
Die drei Hauptmerkmale der Enteroviren sind RNS-Gehalt, kubische Symmetrie und nicht eingehüllte Grundstruktur (nacktes Nukleoprotein). Weitere Merkmale sind ihre Größe zwischen 20 und 30 nm (Picornaviren) und ihre Säurefestigkeit zwischen pH 3 und 7, worin sie sich von den Rhinoviren unterscheiden. Die bekannte Ätherresistenz beruht auf dem fehlenden Envelope.
Diese fünf Kriterien der Enteroviren erfüllen anerkanntermaßen die drei Poliovirustypen, 23 Coxsackieviren der Gruppe A (Typ 23 hat sich dabei als Echovirus 9 herausgestellt) neben sechs der Gruppe B und 32 Echoviren (Typ 1 bis 34 ohne die ausgegliederten Typen 10 und 28). Es handelt sich zur Zeit also insgesamt um 64 verschiedene Enteroviren.

Das Virion stellt ein Nukleokapsid dar, dessen 1-Strang-RNS vermutlich von 32 Proteinkapsomeren umgeben ist. In Virussuspensionen finden sich auch leere Kapside, sog. Ghosts. Durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten kommt es dementsprechend zum Auftreten verschiedener Banden. Die D-Bande besteht aus Nukleokapsiden mit oder ohne Infektiosität und mit serologischer D-Reaktivität (D-Antigen oder D-Komponente). Die C-Bande enthält dagegen leere Kapside ohne Infektiosität und mit serologischer C-Reaktivität (C-Antigen oder C-Komponente). Enterovirusinfektionen führen zunächst zur Bildung von C-reaktiven und danach von D-reaktiven Antikörpern, die in derselben Reihenfolge wieder verschwinden. Da natives D-Antigen durch Hitzeabbau in C-Antigen verwandelt wird, bezeichnet man das eine auch als D/N-

und das andere als C/H-Antigen. Beide sind für jeden Virustyp spezifisch, ein Gruppenantigen ist unbekannt. Ihre Messung erfolgt im wesentlichen durch eine Komplementbindungsreaktion, so daß man auch von komplementbindenden Antigenen bzw. Antikörpern spricht.

Thematik

Aufgabenstellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit waren die Trennung von Enterovirus-Antigenen bzw. die Charakterisierung ihres Verhaltens im Zellulose-Ionenaustauscher. Dies erforderte auch eine Konzentrierung der Antigene.

Um die Trennung von C- und D-Antigen beurteilen zu können, mußten ihre komplementbindenden Titer bestimmt werden. Das native Virus war anhand seiner Infektiosität zu bestimmen, wobei sich eine Übereinstimmung mit der D-Reaktivität voraussetzen ließ.

Als Konzentrierungsverfahren wählten wir zwei Entsalzungsmethoden und zwei Mehrschrittverfahren, die nicht auf Entsalzung beruhten. Der erste Schritt war eine Fällung mit Polyphosphorsäure, der sich eine Ultrazentrifugation mit oder ohne Zwischenschaltung einer Butanolextraktion anschloß. Soweit die oben genannten Konzentrierungsverfahren ineffektiv waren, bedienten wir uns der Viruskonzentration durch Evaporation. Bei diesen Versuchen führten wir Poliomyelitisvirus Typ 1 als Kontrollvirus mit.

Bei den anschließenden chromatographischen Untersuchungen der Konzentrate mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen versuchten wir, die Antigene der von uns ausgesuchten Vertreter der einzelnen Enterovirusgruppen mittels eines phosphatgepufferten Kochsalzgradienten voneinander zu trennen. Die dabei erhältlichen Elutionsdiagramme waren gleichzeitig zur Charakterisierung der Viren gedacht.

Material und Methoden

1. Virusvermehrung und Antigengewinnung

a. Virusstämme

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden als Vertreter der Poliomyelitisviren der Serotyp 1 (Stamm Mahoney), der Coxsackieviren die Serotypen A9 (Stamm Woods), B4 (Stamm Burrier) sowie B5 (Stamm Faulkner) und der Echoviren der Serotyp 9 (Stamm Hill) herangezogen.

b. Zellkultur

Die Vermehrung der genannten Viren erfolgte in HeLa-Zellen. Zunächst wurde der Zellstamm in Penicillinflaschen mit Hilfe eines Wachstumsmediums vermehrt und zur Ausbildung eines Zellrasens gebracht. Das Kulturmedium enthielt nebst Phenolrot als Indikator die Salzkombination nach EARLE (1), Caseinhydrolysat nach LEPINE (2), 10% Kälberserum zur Wachstumsförderung, 200 Einheiten Penicillin G und 200 Mikrogramm Streptomycin pro ml. Gut ausgebildete Zellrasen wurden mit Earles Salzlösung gewaschen. Als Erhaltungsmedium diente serumfreies Zellkulturmedium, mit dem die Zellen unmittelbar vor ihrer Beimpfung versetzt wurden.

c. Gewinnung des Rohantigens

Die Beimpfung der Penicillinkolben erfolgte mit dem jeweiligen Virusstamm. Das Impfvirus vermehrte sich dann im Verlauf von zwei Tagen mit zunehmendem zytopathischen Effekt. Die Passage wurde nach Abzweigen einer kleinen Probe zur bakteriologischen Sterilitätsprüfung durch Abkühlen von 37°C auf -20°C beendet. Damit stand ein Rohantigen zur Verfügung; das vor Gebrauch aufgetaut und zentrifugiert wurde.

d. Herstellung der Testantigene

Die infizierten HeLa-Zellen wurden durch das Einfrieren und Auftauen zerstört. Freigesetzte Viren und Zellreste reicherten sich dabei in der Suspension an. Zur Abschei-

dung des Zelldetritus wurde eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 2000 g durchgeführt. Die Testantigene wurden weiterhin je nach Bedarf bei 4°C oder -20°C verwahrt.

2. Virusausfällung durch Entsalzung

Da sich die Viren hinsichtlich ihrer Löslichkeit wie Proteine verhalten und dabei den Globulinen ähneln, sind sie wie die meisten Globulärproteine in reinem Wasser schlechter löslich als bei Zusatz geringer Salzkonzentrationen. Dieses Verhalten kann man sich sowohl bei der Ausfällung als auch beim Einsalzeffekt zunutze machen.

a. Entsalzung mit Hilfe von Ionenaustauschern

Es wurden zwei Austauscher gemischt, Dowex 1 (Serdolit-Blau) und Dowex 50W (Serdolit-Rot). Ersterer ist ein stark basischer Anionenaustauscher mit Erschöpfungsindikator, dessen Korngröße zu 90 % zwischen 0,6 und 0,3 mm liegt. In der OH-Form ist Carbonat das Gegenion. Die maximale Kapazität beträgt 1,2 val/l. Weitere Merkmale: Umschlag nach Gelb, Substanz pro analysi. Demgegenüber ist Dowex 50W ein stark saurer Kationenaustauscher mit Erschöpfungsindikator, dessen Korngröße zu 90% zwischen 0,8 und 0,4 mm liegt. Das Gegenion ist H^+. Die maximale Kapazität beträgt 1,8 val/l. Der Farbumschlag erfolgt nach Gelbbraun, Substanz p.a. (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg).
Zur Bereitung eines Mischbettaustauschers wurde eine 2 l fassende Mensur mit 1,3 l Serdolit-Blau und 0,7 l Serdolit-Rot dicht gefüllt. Das Gemisch wurde in eine Zehnliterflasche überführt und zweimal mit je 4 l A. dest. gewaschen. Als Filtermaterial diente gewässertes und in A. dest. ausgekochtes Perlongewebe. Das Gemisch wurde dann auf Filterpapier über Zellstofflagen getrocknet und in feuchtem, nicht triefendem Zustand bei 4°C aufbewahrt.
Die Entsalzung erfolgte im Kühlraum. In der Regel wurden pro 100 ml Testantigen 65 ml Serdolit in 6 bis 7 Portionen unter Schütteln in die Virussuspension gegeben. Nach weite-

ren 15 Min. konnte das Ende der Entsalzung festgestellt werden (vereinzelte blaue Körnchen in lilafarbenem Gemisch der Austauscher). Das Austauscher-Virus-Gemisch wurde filtriert, anschließend zweimal mit je 50 ml A. dest. gewaschen. Das Filtrat erschien fein getrübt und farblos; Phenolrot aus dem Erhaltungsmedium störte nicht mehr. Um das Ausmaß der Virusausfällung zu variieren, deren Beginn hier sichtbar wurde, wurden etliche Portionen auf entsprechend kleine Bechergläser verteilt, mit der Laborluft äquilibriert und nach orientierender pH-Messung mit N/50 HCl oder NaOH auf die pH-Werte 4,0 und 4,5 usw. bis 6,0 eingestellt. Zur Kornvergrößerung wurden die Fällungen über Nacht kühl aufbewahrt und schließlich nach einer pH-Kontrolle 15 Min. bei 1000 g zentrifugiert.
Die Überstände wurden sofort und schnell abgegossen, eine Probe wurde zu Testzwecken einbehalten. Die Sedimente wurden in 0,02 M Phosphatpuffer vom pH 7,15 in 0,9%igem NaCl im Sinne einer 10fachen Konzentrierung resuspendiert und bei Kühlraumtemperatur aufgehoben.

b. Entsalzung durch Schlauchdialyse

Dialysiert wurde in Zelluloseesterschläuchen von 18 mm Ø (Kalle, Wiesbaden) gegen A. dest. bei 4°C. Das Verhältnis von Testantigen zu Außenmedium betrug 1:50. Durch Massage bzw. Magnetrührung wurde so weit wie möglich für eine gleichmäßige Durchmischung gesorgt. Vier Tage lang erfolgten ein bis zwei Wasserwechsel pro Tag. Am dritten Tag erschien in der Virussuspension ein weißer, flockiger Niederschlag. Nach beendeter Dialyse wurde 15 Min. bei 1000 g zentrifugiert und das Sediment im oben angegebenen Phosphatpuffer (1/40 des Ausgangsvolumens) resuspendiert.

3. Virusfällung mit Hilfe von Polyphosphaten

Beim Ansäuern über den isoelektrischen Punkt hinaus laden sich Virusproteine mehrfach positiv auf. Sie bilden dann als Polykationen wahrscheinlich unlösliche Komplexe mit

Polyanionen (Polyanionfällung). Als Fällungsmittel eignen sich Polyphosphorsäuren und andere polyvalente Säuren. Für unsere Versuche stand sog. technische Polyphosphorsäure zur Verfügung, die etwa 83% P_2O_5 enthalten sollte oder anders ausgedrückt 60% $H_5P_3O_{10}$ + 15% $H_4P_2O_7$ + 10% $(HPO_3)_6$ + 15% $(HPO_3)_x$ mit einem MG um 340 (Fluka, Buchs, Kanton SG).

Mit einem Glasstab wurden 4 g der sirupartigen Polyphosphorsäure eingewogen und mit A. dest. auf 50 ml aufgefüllt, so daß nach gründlicher Mischung 80 mg Polyphosphat pro ml Verdünnung vorlagen. Die Fällung wurde durch Zusatz von 2 mg Polyphosphat pro ml Testantigen vorgenommen.
400 ml Antigen wurden unter pH-Kontrolle mit verdünnter Polyphosphorsäure versetzt, mit 1 N HCl oder NaOH auf pH 3,0 eingestellt und wenigstens 30 Min. kühl gelagert. Anschließend wurde 15 Min. bei 1000 g zentrifugiert.
Die Überstände wurden mit 1 N NaOH nach Maßgabe des Phenolrots realkalisiert. Die Resuspension der Sedimente erfolgte mit Hilfe von 0,04 M Na_2HPO_4 und 0,02 M neutralem Phosphatpuffer unter NaCl-Zusatz in 1/50 des Ausgangsvolumens.

Zur Entfernung von Fremdeiweiß wurde das resuspendierte Sediment im Verhältnis 1:1 mit kaltem Butan-1-ol eine Stunde extrahiert (Magnetrührer mit Eisbad). Die resultierende Emulsion ließ sich binnen 15 Min. bei 1000 g in der Kühlzentrifuge in eine gelbliche Butanolphase, eine weiße Interphase, eine rötliche Wasserphase und ein hauchdünnes Sediment auftrennen. Während sich das Fremdeiweiß in der Interphase anreicherte, gelangte das Virus in die wäßrige Phase.

4. Viruskonzentration durch Ultrazentrifugation

Die weitere Antigeneinengung wurde mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge von Beckman, Modell Spinco L 50 oder L 2 65 B, in den Schwingbecherrotoren SW 39 (vier Stunden, 35000 Umdrehungen pro Minute) oder SW 65 (drei Stunden,

55000 Umdrehungen pro Minute) vorgenommen. Nach dem Lauf wurden die klaren Überstände dekantiert und kalt aufbewahrt, die braunen, sirupartigen Sedimente in 0,02 M Phosphatpuffer vom pH 7,2 aufgenommen.

5. Viruskonzentration durch Evaporation

Konzentriert wurde in U-förmig aufgehängten Zelluloseesterschläuchen von 18 mm Durchmesser (Kalle, Wiesbaden) im Luftstrom eines gewöhnlichen Kaltluftventilators bei Raumtemperatur. 100 ml Testantigen wurden so auf etwa 25 ml eingeengt. Zur Normalisierung der Salzkonzentrationen wurde drei Tage lang bei 4°C und einem bis zwei Pufferwechseln pro Tag gegen 0,02 M Phosphatpuffer vom pH 7,2 (ohne NaCl) dialysiert. Ein Magnetrührer förderte den Konzentrationsgradienten der beteiligten Salze. Am Ende der Dialyse ließ sich innen eine feine Trübung beobachten. Das Suspensionsvolumen wurde mit oben angegebenem Puffer auf 33 ml gebracht.

6. Trennung von Viruskomponenten durch Säulenchromatographie

Als Adsorbens diente Cellex-E, ein ECTEOLA-Cellulose-Anionenaustauscher mit austauschenden Gruppen tertiärer Amine und einer Austauschkapazität von 0,38 val/kg (Bio-Rad, München). 10 g Cellex-E wurden mehrfach mit 300 ml 0,02 M Phosphatpuffer vom pH 7,2 (ohne NaCl) je 15 Min. bei Raumtemperatur gewaschen (Magnetrührer). Zur Herstellung der Chromatographiesäulen wurden Glasrohre von 1 cm Innendurchmesser und mit englumiger Ausflußöffnung verwendet. Zur Fixierung des Adsorbens dienten Glaswolle und Seesand am unteren Ende der Säule. Nach Verschluß des Ausflußstutzens mit Hilfe einer Reguliervorrichtung wurden Säulen von 1 cm Durchmesser und 2 - 5 cm Höhe gegossen.
Zur Elution nach Aufgabe des Antigens wurden 40 ml 0,02 M Phosphatpuffer benutzt, davon die ersten 10 ml ohne NaCl, die übrigen mit 0,1 M, 0,2 M bzw. 0,3 M NaCl. Die Entnahme

geschah automatisch durch einen Fraktionssammler (LKB, Schweden). Etwa 40 Fraktionen zu je 1 ml wurden gewonnen.

7. Komplementbindungsreaktion (KBR)

a. KBR nach SCHMIDT und LENNETTE (3)

Die KBR wurde mit dem Microtiter-System auf Lucit-Platten durchgeführt, wobei Volumina von 0,025 ml überpipettiert wurden. Das Antigen wurde mit dem nach MAYER (4) modifizierten Veronalpuffer geometrisch verdünnt. 0,025 ml einer Antigenverdünnung wurde die gleiche Menge Antiserum (2 Einheiten) und die doppelte Menge Komplement (2 Einheiten) zugefügt. Die Platten wurden 18 Stunden bei 4°C inkubiert (Kältebindung), anschließend je 30 Min. bei 37°C vor und nach Zusatz von 0,025 ml sensibilisierter Hammelerythrozyten. Antigen-, Serum- und Komplementkontrollen (letztere in arithmetischer Verdünnung und unter Zugabe von Antigen) wurden stets mitgeführt. Das Ausmaß der Hämolyse wurde mit einer Genauigkeit von plus oder minus 25% geschätzt. Zur Ablesung der Titer wurden die höchsten Verdünnungen mit 0- oder 25%iger Hämolyse herangezogen.

b. KBR nach FULTON und DUMBELL (5)

Bei dieser Methode wurde eine Komplementverdünnungsreihe mit dem Faktor 1,6 (logarithmisch 0,2) hergestellt. Für jede Reihe blieben Antigen und Antikörper selbst unverdünnt.
Mit einer Tropfpipette, deren Tropfengröße auf 0,02 ml eingestellt war, wurden die verschiedenen Reaktionspartner in beliebiger Reihenfolge zusammengegeben. Dazu wurden Plexiglas-Platten nach einem System der WHO benutzt. Als Komplement diente bei -20°C gelagertes Serum von Meerschweinchen. Für eine einzelne Titration ergaben sich vier Reihen mit je acht Cups, zwei davon für Serumkontrollen und die beiden anderen für Antiserum bzw. (Meerschweinchen-)Normalserum. Jedes Cup bekam entweder einen Tropfen Veronalpuffer

nach MAYER (4) oder des zu untersuchenden Antigenmaterials, ferner einen Tropfen des jeweiligen Serums (standardisiert und plattenweise getrennt) und der Komplementverdünnung von 1:8 bis 1:200 (mit 2,5 bis 0,1 mm^3 Komplement, logarithmisch 0,4 usw.).

Zu untersuchendes Antigen, Antikörper und Komplement wurden 16 Stunden bei 4°C gelagert, bevor das hämolytische System zugegeben wurde: 0,5 ml einer 1o%igen Hammelblutkörperchensuspension, die dreimal in Veronalpuffer gewaschen worden war, wurden mit 0,5 ml 1:100 vorverdünntem Ambozeptor der Behringwerke vom Titer 1:4000 und 9 ml Veronalpuffer versetzt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach wurde mit der gleichen Pipette wie oben in jede Vertiefung der Platten ein Tropfen hämolytisches System gegeben und durch leichtes Klopfen vermischt. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Platten in feuchte Tücher gehüllt, bevor sie 90 - 120 Minuten bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt wurden.

Zur Ablesung und Berechnung der gebundenen log. Komplementeinheiten wurden die auf ein halbes Zehntel geschätzten Logarithmen bei 50%iger Hämolyse herangezogen. Die gebundene Komplementmenge selbst war $T = \frac{(SA)-(S)-(A)+(K)}{(K)}$ (6).

(SA) war der Komplementverbrauch im Hauptversuch, d.h. die für 50%ige Hämolyse benötigte Komplementmenge in Gegenwart von Antigen und Antikörper. Die Korrekturen berücksichtigten den antikomplementären Effekt von Antigen (A), spezifischem Serum (S) bzw. Kontrollserum (K). Das Endergebnis wurde logarithmisch angegeben. Ausgewertet wurden nur positive Logarithmen und Logarithmus T = 0; letzteres bedeutete, daß eine Komplementeinheit gebunden wurde.

8. Infektiositätsbestimmung

Die Infektiositätsermittlung erfolgte in HeLa-Zellen. In Earles Medium wurden ganzlogarithmische Verdünnungen der Antigene hergestellt und pro Verdünnungsstufe 0,25 ml

in jeweils 2 bis 4 Röhrchen verimpft. Sie enthielten 1,5 ml Erhaltungsmedium. Drei Tage nach Viruseinsaat erfolgte Mediumwechsel. Die Beobachtungszeit betrug insgesamt sieben Tage. Der Infektiositätstiter wurde nach der Methode von REED und MUENCH (7) bestimmt.

Versuchsergebnisse

1. Konzentrierung mit Hilfe von Ionenaustauschern

a. Coxsackievirus Typ B5

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zweier Versuchsreihen mit abgestuften pH-Werten zusammengefaßt. In beiden Fällen ergab sich eine 1,8fache Verdünnung für den Überstand und eine 5,6fache Konzentrierung für das Sediment bezogen auf das Ausgangsvolumen. Bei pH 4,5 zeigte sich ein C/D-Titer von 2 bis 4 KB-Einheiten entsprechend einer Antigenausbeute von 9 bis 18%. Die Infektiosität wies bei leicht ansteigenden werten ein Plateau zwischen pH 4,5 und 5,0 auf, wobei sich allerdings nur etwa 1% davon wiederfand.
Bei einem ergänzenden, nicht mit aufgeführten Versuch mit einem spontan auftretenden pH-Wert von 4,7 betrug die Infektiosität im Sediment $10^{7,5}ID_{50}$-Einheiten bzw. 8,9% derjenigen des Ausgangsmaterials.
Insgesamt waren Antigen- und Infektiositätsausbeute nicht befriedigend, so daß nach anderen Konzentrierungsmethoden für dieses Virus gesucht werden mußte.

b. Echovirus Typ 9

Die Konzentrierung von Echovirus 9 mit Hilfe von Ionenaustauschern gibt die Tabelle 2 wieder. Außer einer Versuchsreihe mit abgestuften pH-Werten wurde eine weitere Sedimentation ohne pH-Korrektur untersucht. Bei 22- bzw. 40facher Konzentrierung ergaben sich maximale C/D-Titer von 1:16 bzw. 1:24. Sie entsprachen einer Antigenausbeute von 36% zwischen pH 5 und 6 sowie von 30% bei spontan auftretendem pH.

2. Konzentrierung mittels Schlauchdialyse

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe aufgeführt. Coxsackievirus Typ B4, B5 und Echovirus Typ 9 wurden im Dialyseverfahren 40fach konzentriert. Der Anti-

	Ausgang	Überstand	Sediment bei pH 4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
Antigenmenge in ml	17 11	30 20	3,0 2,0	3,0 2,0	3,0 2,0	3,0 2,0	3,0 -
C/D-Titer	1: 4 1: 4	1:<2 1:<2	1: 2 1: 2	1: 2 1: 4	1: 2 1: 2	1: 2 1: 2	1: 2 -
Infektiosität in ID_{50}-Einheiten	- $10^{7,8}$	- $10^{5,5}$	- $10^{6,3}$	- $10^{6,5}$	- $10^{6,5}$	- $10^{6,8}$	- -
Infektiosität in Prozenten	- 100	- 0,9	- 0,6	- 0,9	- 0,9	- 1,8	- -

Tabelle 1: Konzentrierung von Coxsackievirus B5 mit Hilfe von Ionenaustauschern (Abschnitt 1.a. der Ergebnisse)

	Ausgang	Überstand	Sediment bei pH 5,0	5,5	6,0	6,5	Sediment
Antigenmenge in ml	22 100	40 -	1,0 -	1,0 -	1,0 -	1,0 -	- 2,5
C/D-Titer	1: 2 1: 2	1:<2 1:<2	1:16 -	1: 8 -	1:16 -	1: 4 -	- 1:24

Tabelle 2: Konzentrierung von Echovirus 9 mit Hilfe von Ionenaustauschern (Abschnitt 1.b. der Ergebnisse)

Antigen	Ausgang		Überstand		Sediment		Antigen-ausbeute %
	ml	C/D-Titer	ml	C/D-Titer	ml	C/D-Titer	
Coxsackie-virus B4	100	1: 2	115	1:<2	2,5	1: 8	10
Coxsackie-virus B5	95	1: 2	110	1:<2	2,4	1:40	50
Echovirus Typ 9	100	1: 4	115	1:<2	2,5	1:32	20

Tabelle 3: Konzentrierung von Coxsackievirus Typ B4, B5 und Echovirus Typ 9 mittels Schlauchdialyse (Abschnitt 2. der Ergebnisse)

genverlust bei diesen Versuchen war sehr unterschiedlich. Während bei Coxsackievirus B5 noch 50% des Gesamtantigens im Sediment nachgewiesen werden konnten, betrug die Ausbeute bei Echovirus 9 und Coxsackievirus B4 nur 20% bzw. 10%.

3. Mehrschrittverfahren zur Viruskonzentration

Es wurden zwei verschiedene Mehrschrittverfahren auf ihre Brauchbarkeit geprüft.

a. Polyphosphatfällung, Butanolextraktion, Ultrazentrifugation

In Tabelle 4a sind die Ergebnisse einer Konzentrierung dreier Enteroviren zusammengefaßt, in Tabelle 4b die Antigenausbeuten in Prozenten. Coxsackievirus A9, B5 und Echovirus 9 wurden durch die Fällung 50fach und durch die spätere Ultrazentrifugation etwa 286fach konzentriert. Die zwischengeschaltete Butanolextraktion führte als Reinigungsschritt zu keiner Volumeneinengung. Bei der Polyphosphatfällung ergaben sich Titeranstiege sowohl in der KBR als auch bei der Infektiosität, die in Antigenausbeuten von 32% für Coxsackievirus A9 bzw. bis zu 100% bei Coxsackievirus B5 und Echovirus 9 resultierten. Nach Butanolextraktion fand sich in der wäßrigen Phase in der Regel weniger Virus wieder, was sich auch in entsprechend verminderten Antigenausbeuten ausdrückte. Nur bei den beiden Coxsackieviren blieb die Infektiosität mit 32% bzw. 100% unverändert. Bei der Ultrazentrifugation wurden C/D-Titer von 1:80 und Infektiositätswerte von maximal $10^{9,3}$ ID_{50}-Einheiten erreicht. Dies entsprach einer Antigenausbeute von 94% bei Coxsackievirus B5, von 13 bis 65% bei Echovirus 9 und von 11 bis 14% bei Coxsackievirus A9.

b. Polyphosphatfällung, Ultrazentrifugation

Wegen der Antigenverluste bei der Butanolbehandlung wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, deren Ergebnisse

Antigen	Ausgang			Polyphosphatfällung			Butanolextraktion			Ultrazentrifugation		
	ml	C/D-Titer	ID_{50}	ml	C/D-Titer	ID_{50}	ml	C/D-Titer	ID_{50}	ml	C/D-Titer	ID_{50}
Coxsackievirus A9	400	1: 2	$10^{5,3}$	8	1:32	$10^{6,5}$	8	1:16	$10^{6,5}$	1,4	1:80	$10^{6,8}$
Coxsackievirus B5	400	1:10	$10^{6,9}$	8	1:40	$10^{8,6}$	8	1:10	$10^{8,6}$	1,5	-	$10^{9,3}$
Echovirus Typ 9	400	1: 2	$10^{6,2}$	8	1:64	$10^{7,9}$	8	1:32	$10^{7,8}$	1,3	1:80	$10^{8,5}$

Tabelle 4a: Konzentrierung von Coxsackievirus Typ A9, B5 und Echovirus Typ 9 im Mehrschrittverfahren (Polyphosphatfällung, Butanolextraktion, Ultrazentrifugation)

Antigen	Antigenausbeute nach					
	Polyphosphatfällung		Butanolextraktion		Ultrazentrifugation	
	KBR	Infektiosität	KBR	Infektiosität	KBR	Infektiosität
Coxsackie-virus A9	32	32	16	32	14	11
Coxsackie-virus B5	8	100	2	100	-	94
Echovirus Typ 9	64	100	32	80	13	65

Tabelle 4b: Antigenausbeute in Prozenten bezogen auf das Ausgangsmaterial (Abschnitt 3.a. der Ergebnisse)

in Tabelle 5a und b zusammengestellt sind. Es wurden wiederum Coxsackievirus A9, B5 und Echovirus 9 sowie als Kontrolle Poliomyelitisvirus Typ 1 untersucht, und zwar mit Hilfe der Infektiositätstitration. Sämtliche Viren wurden etwa 40fach bei der Fällung und schließlich 100fach bei der nachfolgenden Ultrazentrifugation konzentriert. Mit der Polyphosphatfällung ergaben sich Titeranstiege bei Coxsackievirus A9, B5 und Echovirus 9, die Infektiositätsausbeuten von etwa 25%, 80% bzw. 75% entsprachen. Bei der unmittelbar anschließenden Ultrazentrifugation fiel der Titer bei Coxsackievirus A9 wieder ab, während er bei den anderen untersuchten Viren weiter anstieg. Die Ausbeuten betrugen nach diesem Schritt bezogen auf das Ausgangsmaterial 2% bei Coxsackievirus A9, etwa 60% bei Coxsackievirus B5 und 50% bei Echovirus 9. Das zur Kontrolle mitgeführte Poliovirus ließ sich nach beiden Konzentrierungsschritten hundertprozentig nachweisen.

4. Säulenchromatographie von Poliomyelitisvirus Typ 1

Bei Poliovirus wurde in einer ersten Versuchsreihe das Antigenkonzentrat aus Polyphosphatfällung und anschließender Ultrazentrifugation säulenchromatographisch fraktioniert und danach auf C/D- und C-Reaktivität geprüft. In einer zweiten Serie wurde weniger konzentriertes Virus aus der Evaporation als Ausgangsmaterial benutzt und nach Fraktionierung auf D-Reaktivität, C-Reaktivität und Infektiosität untersucht. Die erhaltenen Werte sind in den Abbildungen 1a und b gegen die stufenweise ansteigenden NaCl-Konzentrationen im verwendeten Phosphatpuffer aufgetragen, wobei sich die Stufen selbst refraktometrisch einwandfrei wiedererkennen ließen.

In Abbildung 1a sind C/D- und C-Reaktivität der ersten Versuchsreihe einander gegenübergestellt. Der C/D-Antigengehalt des Ausgangsmaterials (etwa 2 log. Komplementeinheiten) erschien bereits zum größten Teil im kochsalzfreien

Antigen	Ausgang		Polyphosphatfällung		Ultrazentrifugation	
	ml	ID_{50}-Einheiten	ml	ID_{50}-Einheiten	ml	ID_{50}-Einheiten
Poliomyelitis-virus Typ 1	390	$10^{8,0}$	10	$10^{9,6}$	3,9	$10^{10,0}$
	400	$10^{8,3}$	10,5	$10^{9,9}$	4,0	$10^{10,3}$
Coxsackie-virus Typ A9	400	$10^{5,8}$	11,9	$10^{6,7}$	4,0	$10^{6,0}$
Coxsackie-virus Typ B5	400	$10^{7,2}$	10	$10^{8,7}$	4,0	$10^{9,0}$
	400	$10^{7,2}$	10,2	$10^{8,7}$	4,0	$10^{8,9}$
Echovirus Typ 9	400	$10^{8,2}$	11,9	$10^{9,6}$	4,0	$10^{9,9}$

Tabelle 5a: Konzentrierung von Poliovirus Typ 1, Coxsackievirus Typ A9, B5 und Echovirus Typ 9 mittels Polyphosphatfällung und Ultrazentrifugation

Antigen	Ausgang	Infektiositätsausbeute nach	
		Polyphosphatfällung	Ultrazentrifugation
Poliomyelitis-virus Typ 1	100	100	100
	100	100	100
Coxsackie-virus Typ A9	100	24	2
Coxsackie-virus Typ B5	100	79	63
	100	81	50
Echovirus Typ 9	100	75	50

Tabelle 5b: Infektiositätsausbeute in Prozenten bezogen auf das Ausgangsmaterial (Abschnitt 3.b. der Ergebnisse)

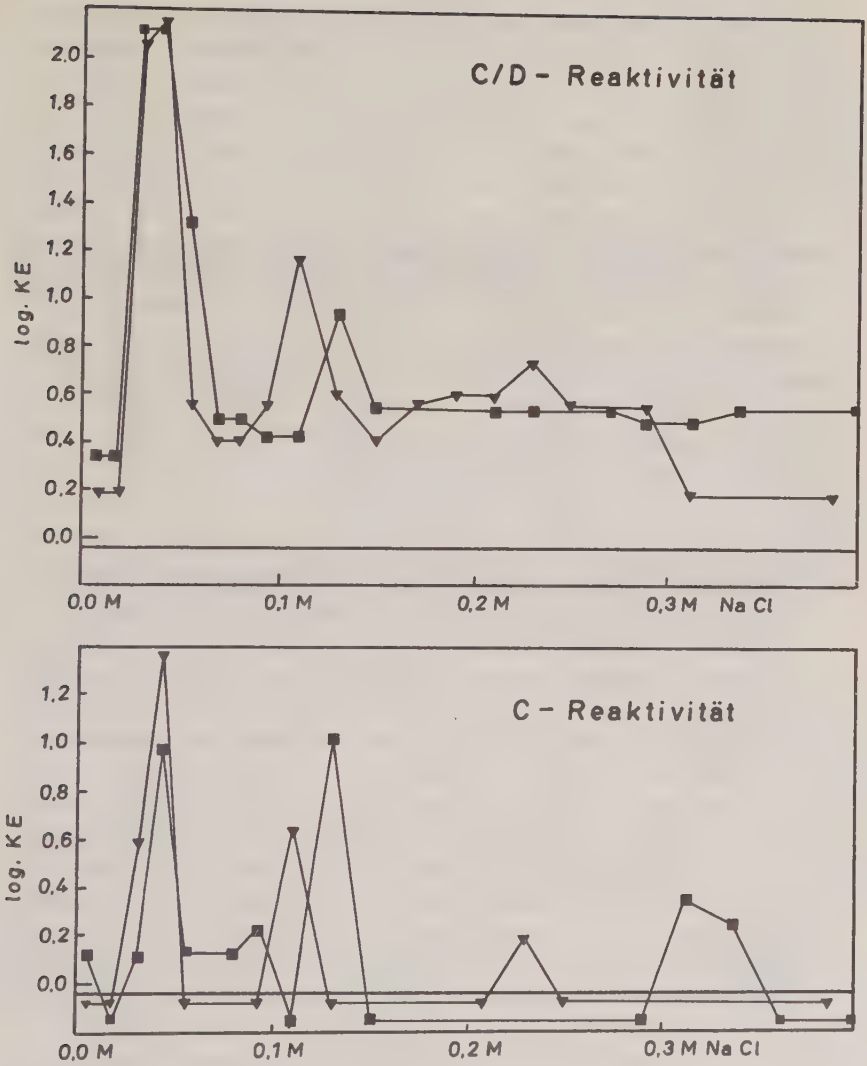

Abbildung 1a: Säulenchromatographie von Poliovirus Typ 1 (Abschnitt 4. der Ergebnisse)

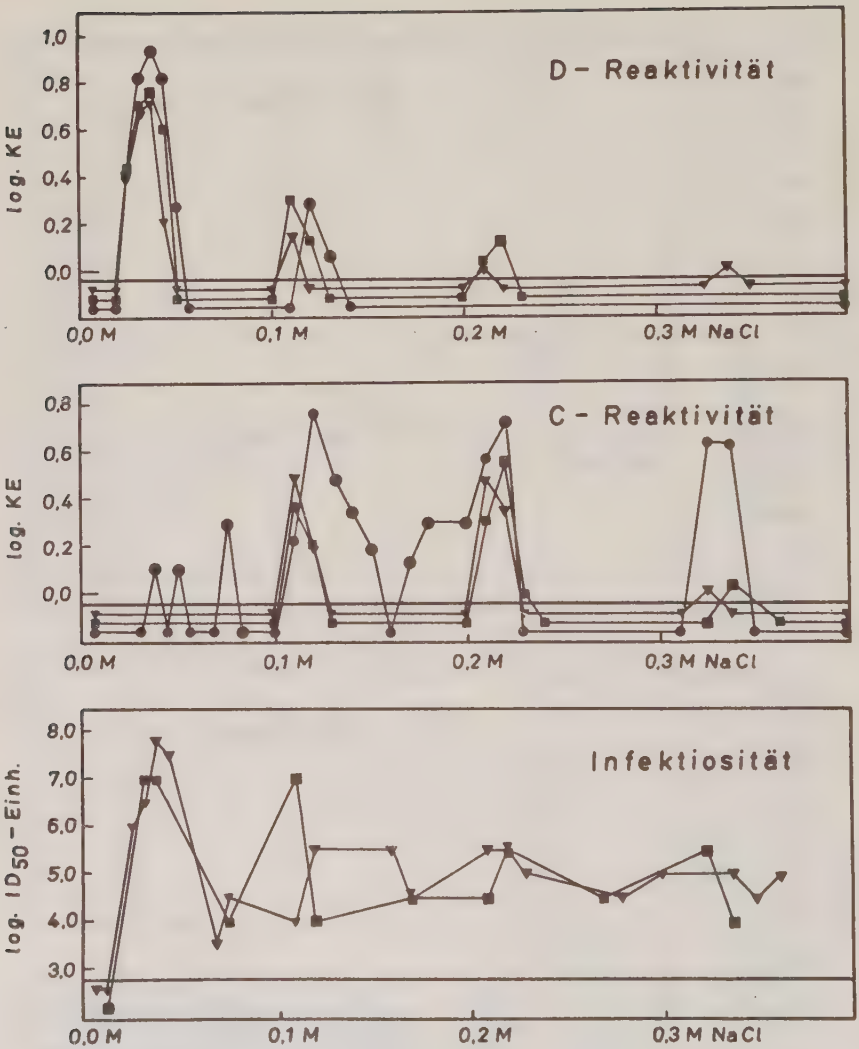

Abbildung 1b: Säulenchromatographie von Poliovirus Typ 1 (Abschnitt 4. der Ergebnisse)

Eluat wieder. Hier lag ein Maximum von annähernd 2,2 log. Komplementeinheiten vor. Ein zweiter Gipfel bei 0,1 M NaCl erreichte nur noch etwa 1,2 log. KE entsprechend einem Abfall des Antigengehaltes auf ein Zehntel. Bei den höheren NaCl-Konzentrationen fiel die Kurve bis auf Werte um 0,2 log. KE ab, ohne die Nullinie zu erreichen. Das Verhalten der C-Komponente zeigte einen anderen Kurvenverlauf. Von einem Ausgangsmaterial mit 1,75 bzw. 1,06 log. Komplementeinheiten wurden etwa 60% im kochsalzfreien Eluat und etwa 40% bei 0,1 M NaCl wiedergefunden. Vergleicht man beide Kurven miteinander, so fällt eine weitgehende Übereinstimmung bei 0,1 M NaCl auf. Daraus folgt, daß hier im wesentlichen C-Antigen eluiert wurde. Der abweichende Kurvenverlauf beim kochsalzfreien Eluat mit Titerdifferenzen von etwa einer logarithmischen Komplementeinheit (Faktor 10) läßt auf eine Anreicherung der D-Komponente schließen. Im übrigen ergaben sich nur noch Spuren der D-Reaktivität bei 0,2 und 0,3 M NaCl.

In Abbildung 1b sind die Ergebnisse der zweiten Versuchsserie graphisch dargestellt. An Stelle der C/D-Reaktivität wurden ihre beiden Komponenten gemessen. Parallel dazu wurden die Fraktionen auf Infektiosität geprüft. Die D-Reaktivität des Ausgangsmaterials lag bei 0,87 bis 1,48 log. Komplementeinheiten und ließ sich großenteils bereits durch kochsalzfreien Phosphatpuffer eluieren. Der Rest erschien bei 0,1 M NaCl. Die C-Komponente verteilte sich bei einem Ausgangstiter von 1,13 bis 1,48 log. Komplementeinheiten etwa gleichmäßig auf die zweite und dritte Stufe des Gradienten. In Übereinstimmung mit dem Verhalten der D-Komponente fand sich die Infektiosität des Ausgangsmaterials (7,5 bzw. 8,3 log. ID_{50}-Einheiten) zum größten Teil im kochsalzfreien Eluat wieder.

5. Säulenchromatographie von Coxsackievirus Typ A9

Für diese Versuchsreihe wurde durch Evaporation konzentrier-

tes Virus verwendet. Das Ausgangsmaterial und die einzelnen Fraktionen von drei durchgeführten Versuchen wurden auf C/D-Reaktivität und Infektiosität geprüft. Die Ergebnisse sind fn der Abbildung 2 graphisch dargestellt. Bei einem Ausgangstiter von etwa 13 KE bzw. 1,1 log. KE wurde der überwiegende Anteil der C/D-Reaktivität bei 0,1 M NaCl gefunden. Mit 0,2 M salinem Phosphatpuffer wurde nur noch halb so viel Antigen eluiert. Etwa gleiche Volumina von Ausgangsmaterial und Gipfelfraktionen vorausgesetzt (je 4 ml), verteilte sich die Antigenausbeute ohne Verlust zu 60% auf den ersten und zu 30% auf den zweiten Gipfel, während der Rest bei 0,3 M NaCl zum Vorschein kam (8 KE + 4 KE + 1 KE = 13 KE). Die Infektiosität zeigte folgenden Verlauf. Bei einem Ausgangstiter von 8,0 bis 8,5 log. ID_{50}-Einheiten wurde ein fast ebenso hoher Wert im Bereich von 0,1 M NaCl gesehen. Der Titerabfall bei den höheren NaCl-Konzentrationen war stärker als bei der C/D-Reaktivität und machte jeweils etwa eine Zehnerpotenz aus. Das kochsalzfreie Eluat zeigte übereinstimmend unterschwellige Werte beider Meßgrößen.

6. Säulenchromatographie von Coxsackievirus Typ B5

Coxsackievirus B5 wurde durch Evaporation konzentriert und säulenchromatographisch aufgetrennt. Anschließend wurde auf C/D- und C-Reaktivität sowie Infektiosität geprüft. Die Ergebnisse von drei durchgeführten Versuchen sind in der Abbildung 3 wiedergegeben. Die C/D-Reaktivität verteilte sich im wesentlichen auf die Bereiche von 0,1 und 0,2 M NaCl. Im Ausgang lagen etwa 20 Komplementeinheiten (1,3 log. KE) vor. Der erste Gipfel erreichte in zwei Fraktionen einen Titer von etwa 10 Komplementeinheiten (1 log. KE). Bei einem Ausgangsvolumen von 4 ml und je 1 ml der beiden Gipfelfraktionen betrug die Antigenausbeute somit 25%. Der zweite Gipfel erreichte etwa 5 KE bzw. 0,7 log. KE über 3 ml, was einer Ausbeute von knapp 20% entsprach. Bei

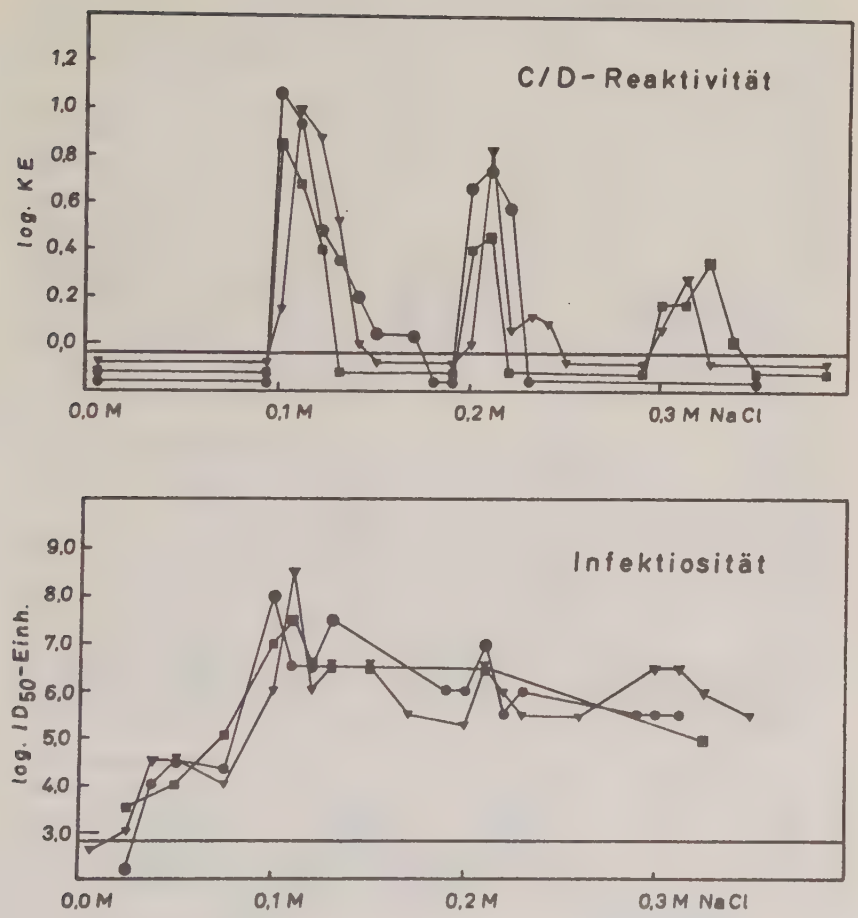

Abbildung 2: Säulenchromatographie von Coxsackievirus Typ A9
(Abschnitt 5. der Ergebnisse)

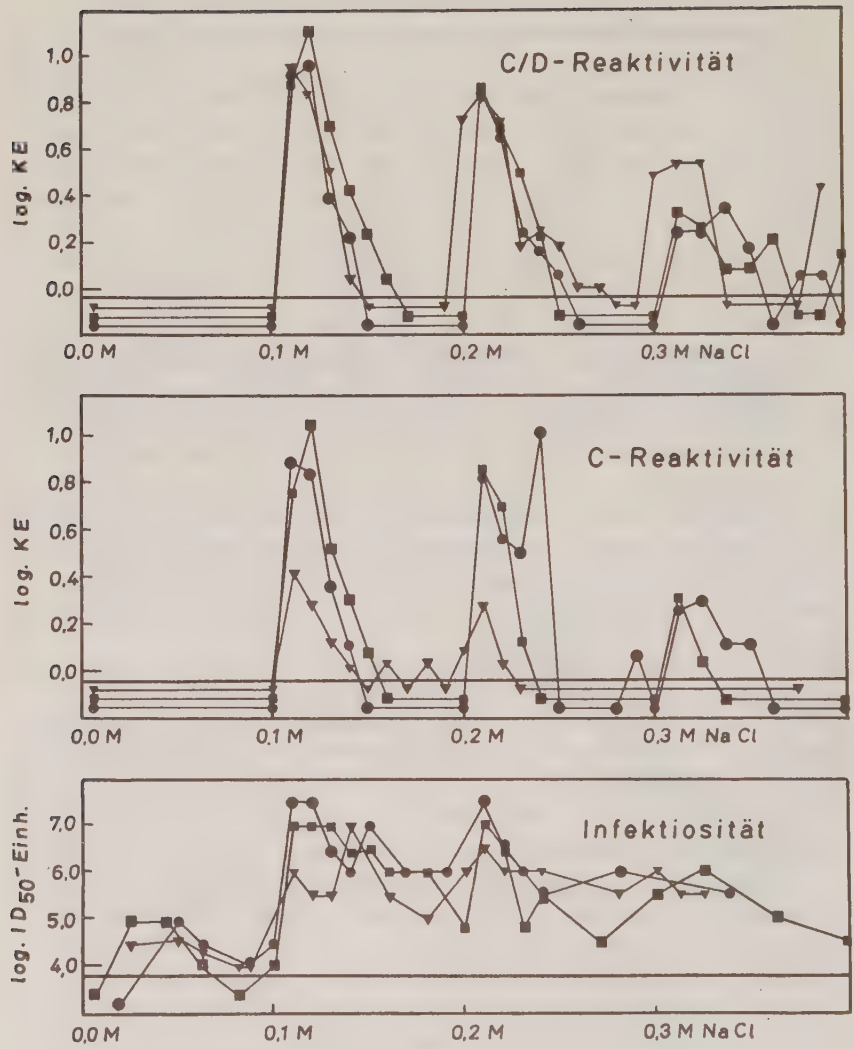

Abbildung 3: Säulenchromatographie von Coxsackievirus Typ B5 (Abschnitt 6. der Ergebnisse)

0,3 M NaCl fanden sich etwa 10% wieder. Die Gesamtausbeute war demnach 55%. Die C-Reaktivität zeigte bei 0,1 und 0,2 M NaCl folgende Verteilung. Bei einem Ausgangstiter von 0,45 bis 1,39 log. KE wurden Werte von etwa 0,8 bzw. 0,7 log. KE erreicht. Bei 0,1 M NaCl lag die C-Reaktivität also 0,2 log. KE (Faktor 1,6) unter der oben angegebenen C/D-Reaktivität, während bei 0,2 M NaCl kein Unterschied zu sehen war. Hier wurde demnach im wesentlichen C-Komponente eluiert. Die Infektiosität verteilte sich in ähnlicher Weise auf die beiden mittleren Stufen des Gradienten. Sie betrug im Ausgangsmaterial knapp 10^8 ID_{50}-Einheiten, bei 0,1 M NaCl nur noch ein Zehntel davon und bei 0,2 M NaCl noch weniger. Hier lag ein relativ schmaler Gipfel vor.

7. Säulenchromatographie von Echovirus Typ 9

Durch Evaporation konzentriertes Virus wurde säulenchromatographisch aufgetrennt und auf C/D-Reaktivität sowie Infektiosität getestet. Die Ergebnisse dreier Versuche sind in der Abbildung 4 dargestellt. Im Ausgangsmaterial war ein C/D-Titer von 5,5 bis 13,5 Komplementeinheiten (0,74 bis 1,13 log. KE). Mit 0,1 M salinem Phosphatpuffer wurden etwa 6,3 KE bzw. 0,8 log. KE eluiert, d.h. bei einem Ausgangstiter von knapp 10 KE ungefähr zwei Drittel des Gesamtantigens. Im Bereich von 0,2 M NaCl war das antigenhaltige Volumen etwa halb so groß wie das des Ausgangs, und die Antigenausbeute betrug demnach bei einem Titer von 5 KE bzw. 0,7 log. KE knapp 25%. Bei der Infektiositätskurve war der Abfall stärker. Mit 0,1 M salinem Phosphatpuffer wurden ebenfalls zwei Drittel der Ausgangsmenge eluiert, d.h. von ursprünglich etwa $10^{6,7}$ ID_{50}-Einheiten hier ungefähr $10^{6,5}$. Bei 0,2 M NaCl fanden sich nur noch 10^6 ID_{50}-Einheiten (ein Fünftel). Dies entsprach bei etwa gleichem Volumenverhältnis wie oben einer Infektiositätsausbeute von 10%. In den übrigen Bereichen des Gradienten ergaben sich nur Reste bzw. Spuren der Ausgangsinfektiosität.

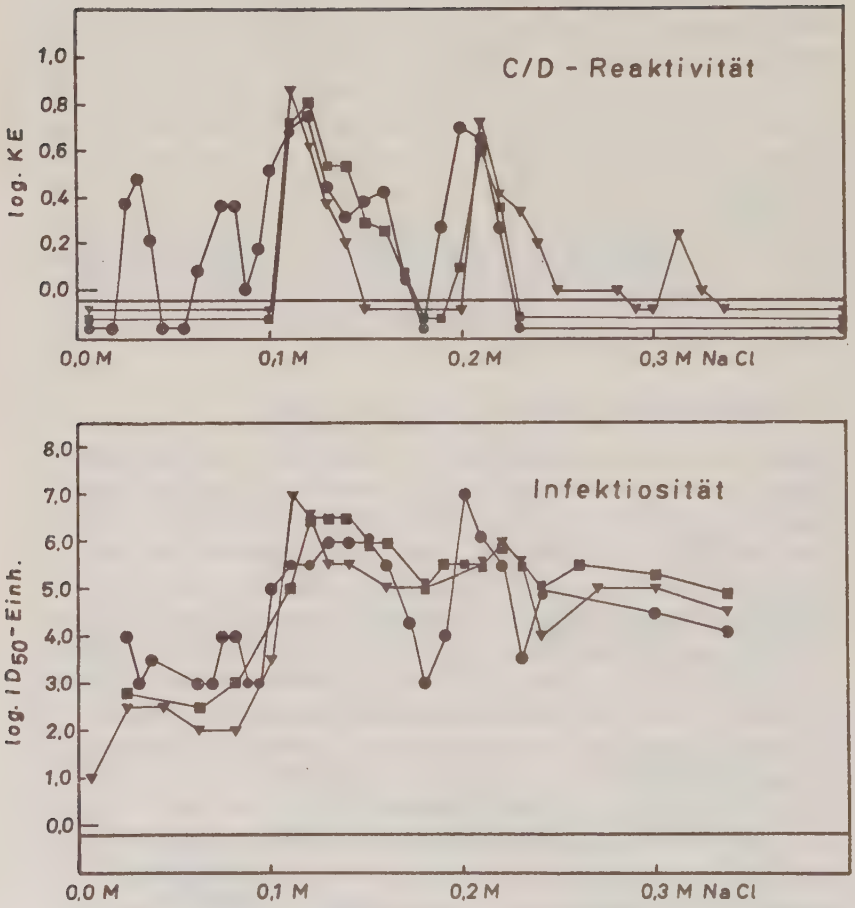

Abbildung 4: Säulenchromatographie von Echovirus Typ 9 (Abschnitt 7. der Ergebnisse)

Diskussion

Die Antigenkomponenten der untersuchten Vertreter der verschiedenen Enterovirusgruppen verhielten sich hinsichtlich der Möglichkeit einer Konzentrierung und Trennung uneinheitlich.

Bei der Konzentrierung von Coxsackievirus Typ B5 mit Hilfe von einem Kationen- und einem Anionenaustauscher im Mischbett waren die Ausbeuten an C/D-Gesamtantigen und Infektiosität unbefriedigend. Ein orientierender Versuch gleicher Art mit Echovirus Typ 9 ergab ebenfalls keine brauchbare Konzentrierung. Polio-Antigene konnten allerdings auf diese Weise konzentriert und gereinigt werden (8). Dabei zeigten sich eine Anreicherung der D-Komponente sowie eine Elimination der C-Komponente, während in unseren Versuchen lediglich ein weitgehender Verlust der D-Reaktivität gemessen an der Infektiosität und damit eine Trennung der C-Komponente ohne besondere Anreicherung möglich waren (Tabelle 1).

Das zweite Konzentrierungsverfahren basierte auf der Schlauchdialyse. Die Coxsackieviren B4 und B5 sowie Echovirus 9 fanden sich gemessen an der C/D-Reaktivität in der KBR zu 10 bis 50% im Konzentrat wieder. Dabei kam Coxsackievirus B5 den bei Polioviren gefundenen Verhältnissen am nächsten. Diese zeigten C- und D-Komponente nebeneinander und vollständig im Sediment bei einer Infektiositätsausbeute von wenigstens 68% (9). Die Möglichkeit einer Konzentrierung der anderen Enteroviren erschien uns daher vergleichsweise zu gering.

Als nächstes prüften wir ein Mehrschrittverfahren auf seine Brauchbarkeit zur Konzentrierung: Polyphosphatfällung, Butanolextraktion, Ultrazentrifugation von Coxsackievirus Typ A9, Typ B5 und Echovirus Typ 9. Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen, Enteroviren zu konzentrieren, zeigten sowohl die Methodenkombination als auch ihre einzelnen Schritte im wesentlichen bessere Ergebnisse. Gemessen an der Infektiosität

ließen sich die D-Komponenten von Coxsackievirus Typ B5 und Echovirus Typ 9 wenigstens zu 65%, in der Regel aber noch weitaus besser konzentrieren. Erkennbar an dem Unterschied zwischen D-Reaktivität und C/D-Reaktivität unterlagen die C-Komponenten einem deutlichen Abbau bzw. einer erheblichen Elimination. Bei Coxsackievirus Typ A9 lag die Antigenausbeute zwischen 11 und 32%, wobei offenbar auch keine Trennung der Antigenkomponenten erfolgte. Bei allen untersuchten Viren führte die Butanolextraktion zu Verlusten des C/D-Gesamtantigens gemessen in der KBR. Ein mit ihr verbundener Infektiositätsverlust wurde bei Echovirus Typ 9 beobachtet, während die beiden Coxsackieviren stabil blieben. Übereinstimmung von D-Reaktivität und Infektiosität vorausgesetzt, spräche dies für eine Elimination der C-Komponente und damit für einen spezifischen Trenneffekt dieses Reinigungsschrittes. Wegen der Antigenverluste schien uns die Butanolextraktion im Hinblick auf die Konzentrierung der genannten Enteroviren nicht erfolgversprechend.

Daher wurde dasselbe Mehrschrittverfahren ohne die Butanolbehandlung untersucht. Bei diesen Versuchen wurde Poliomyelitisvirus Typ 1 als Kontrollvirus mitgeführt. Während bei diesem Virus gemessen an seiner Infektiosität wie schon früher eine jeweils 100%ige Konzentrierung zu erreichen war (10), waren die Ergebnisse der drei anderen Enteroviren unterschiedlich wie zuvor. Coxsackievirus Typ A9 zeigte hierbei Ausbeuten zwischen 2% und 24%. Bei Coxsackievirus Typ B5 waren die Verhältnisse wie schon in dem ersten Mehrschrittverfahren mit denen bei Poliomyelitisvirus Typ 1 vergleichbar. Echovirus Typ 9 zeigte mäßigere Ausbeuten von 75% bzw. 50%, wobei allerdings nur ein Versuch mit Polyphosphatfällung und anschließender Ultrazentrifugation durchgeführt wurde.

Erreichte man mit Hilfe der Polyphosphatfällung eine Volumeneinengung und damit einen besseren Ausgang für die Ultrazentrifugation, so zeigte letztere Methode doch mitunter Antigenverluste. Poliovirus Typ 1 verhielt sich hierbei sta-

bil. Ebenso wurden seine beiden Antigenkomponenten nicht bei der Polyphosphatfällung zerstört (10), während diese auch anderen Autoren zufolge zu einem Abbau des C-Antigens anderer Enteroviren führte, namentlich bei Coxsackievirus Typ B5 (11).

Bei den anschließenden chromatographischen Untersuchungen benutzten wir daher Poliomyelitisvirus Typ 1 als Modellvirus und verglichen zunächst das Verhalten seiner Antigenkomponenten ausgehend von mehr oder weniger stark konzentriertem Material im Hinblick auf eine Trennung von C und D. Da das von uns zuletzt geprüfte Konzentrierungsverfahren (Polyphosphatfällung, Ultrazentrifugation) bei den drei anderen Enteroviren enttäuschte, konzentrierten wir diese lediglich nach einer Methode, deren Wirksamkeit für Poliomyelitisvirus Typ 1 (Stamm Brunhilde) und sechs weitere Vertreter der Enteroviren außer Coxsackievirus A bereits von ALBANO (12) im Prinzip nachgewiesen wurde. Damit war ein Verzicht auf Aufarbeitung größerer Ausgangsmengen verbunden.

Die Säulenchromatographie von Poliovirus Typ 1 zeigte zunächst eine Anreicherung der D-Komponente im kochsalzfreien und der C-Komponente im 0,1 M salinen Eluat. Bei weniger konzentriertem Virus als Ausgangsmaterial waren die Verhältnisse im Prinzip bis auf eine Tendenz zur Streuung der C-Reaktivität über höhere NaCl-Konzentrationen gleich. Gemessen an der Infektiosität fand sich die D-Reaktivität auch hier zur Hauptsache im kochsalzfreien Eluat. Ein sich merklich in die Länge ziehendes Elutionsdiagramm ergab sich bereits bei Poliovirus Typ 2 und Echovirus Typ 13 unter Verwendung von DEAE- statt ECTEOLA-Cellulose (13). Möglicherweise spielte die Viruskonzentration im Verhältnis zur Austauscherkapazität in unseren Versuchen eine ähnliche Rolle. Bis auf diese Einschränkung hatten andere Autoren vergleichbare Ergebnisse:

SCHMIDT (14), GIRON und HELIMAN (15), LEVINTOW und DARNELL (16), HODES et al. (17) sowie HÖHER et al. (18) arbeiteten ohne Kochsalzgradienten und fanden das Virus prompt wieder.

SCHMIDT konnte dabei bereits eine Abtrennung der C-Komponente feststellen. HODES et al. bemerkten an DEAE-Cellulose eine höhere Avidität des Stammes LSc, 2ab gegenüber dem Stamm Mahoney und bezeichneten das betreffende Elutionsmuster als E-Marker; sie fanden im kochsalzfreien Eluat weniger als ein Prozent der Ausgangsinfektiosität. Demgegenüber behaupteten GIRON und HELIMAN, daß eine Trennung genetisch verschiedener Viren unter ihren Versuchsbedingungen nicht möglich war; sie verwendeten allerdings einen höhermolaren Phosphatpuffer zur Elution des Impfstammes von Poliovirus Typ 1. Möglicherweise wurden damit gewisse Stammunterschiede verwischt.

TUMILOWICZ und HUMMELER (19) konnten bei der Chromatographie von Poliovirus Typ 1 an DEAE-Cellulose mit 0,01 bzw. 0,5 M Kaliumphosphatpuffer zunächst D-Antigen mit einer Ausbeute von 40 - 70% und dann C-Antigen mit einer Ausbeute von maximal 19% abtrennen und innerhalb der D-Reaktivität noch einmal zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Partikeln in der Reihenfolge ihrer Elution unterscheiden. Offenbar erreichten sie eine deutlichere Trennung von C und D bzw. eine höhere C-Ausbeute ohne den Einsatz von Kochsalz nicht.

HOYER et al. (13), AINBENDER et al. (20), VINCENT und BETAIL (21) sowie TAYLOR und GRAHAM (22) führten die Chromatographie verschiedener Poliovirusstämme und anderer Viren mit unterschiedlichen Kochsalzkonzentrationen durch. Soweit die drei Typen der Polioviren betroffen waren, erschienen sie bereits weitgehend im kochsalzfreien Eluat (13) bzw. in schwach salinem Milieu unterhalb von 0,1 M NaCl wieder (20, 21, 22). Eine Trennung von C- und D-Komponente wurde aber dabei nicht untersucht.

Die Säulenchromatographie von Coxsackievirus Typ A9 zeigte unter den oben genannten Voraussetzungen eine Elution des D-Antigens bei 0,1 M NaCl, während das kochsalzfreie Eluat praktisch frei war von C/D-Reaktivität und Infektiosität. Das C-Antigen imponierte bei 0,2 M NaCl, da der Infektiositätsverlust hier schon sehr groß war. HOYER et al. (13)

stand für dieses Virus ein stärker konzentriertes Präparat aus der Ultrazentrifuge zur Verfügung, so daß er sich möglicherweise an der Grenze der Austauschkapazität oder aber darüber bewegte. Ihm gelang jedenfalls auch hier die Elution mit kochsalzfreiem Phosphatpuffer, ohne daß C- und D-Antigen in ihrem Elutionsmuster näher charakterisiert werden konnten.

Coxsackievirus Typ B5 ähnelte in seinem Elutionsdiagramm weitgehend Typ A9. VINCENT und BETAIL (21) fanden mit knapp 0,1 M NaCl ohne Phosphatpuffer das komplementbindende und infektiöse Antigen von Typ B5 im Eluat wieder. Sie untersuchten das Verhalten des C-Antigens ebenfalls nicht weiter. Eventuell wären hier feinere Abstufungen der NaCl-Konzentrationen zur genaueren Klärung des Elutionsmusters von Nutzen.

Echovirus Typ 9 wurde unseres Wissens noch nicht säulenchromatographisch untersucht, zeigte aber hinsichtlich der Trennbarkeit seiner Antigenkomponenten in unseren Versuchen keine Überraschungen und verhielt sich etwa wie Coxsackievirus. Auch das von HOYER et al. (13) geprüfte Echovirus Typ 13 erschien zu etwa 90% mit 0,1 M NaCl.

Zusammenfassung

Die Konzentrierung von Coxsackie- und Echoviren nach dem Vorbild einiger Methoden, die für Polioviren effektiv waren, erwies sich im Falle der Entsalzung durch Ionenaustausch bzw. Schlauchdialyse als wenig erfolgreich. Bei der Kombination von Polyphosphatfällung und Ultrazentrifugation zeigten sich mit Ausnahme von Coxsackievirus Typ A9 bessere Antigenausbeuten, wobei die Einschaltung eines Reinigungsschrittes mit Butanol eher zu unmittelbaren Antigenverlusten zu führen schien. Während Poliovirus Typ 1 Ausbeuten von 100% zeigte, lagen diese im Endeffekt bei 50 - 94% für Coxsackievirus Typ B5 und bei 50 - 65% für Echovirus Typ 9.

Die chromatographische Charakterisierung oben genannter Enteroviren an ECTEOLA-Cellulose-Ionenaustauschersäulen brachte für Poliovirus Typ 1 unabhängig vom Antigengehalt des Ausgangsmaterials eine Elution der infektiösen, D-reaktiven Partikeln durch kochsalzfreien Phosphatpuffer und der C-reaktiven Partikeln durch salinen Phosphatpuffer.
Bei den Coxsackieviren Typ A9 und Typ B5 sowie bei dem Echovirus Typ 9 waren die Elutionsdiagramme untereinander etwa gleich. Gegenüber Poliovirus erschienen ihre infektiösen, D-reaktiven Partikeln jedoch nicht bei 0,0 M NaCl, sondern bei 0,1 M NaCl. Die C-reaktiven Partikeln fanden sich bei entsprechend höheren Kochsalzkonzentrationen.

Literatur

1. Earle, W.R.: A technique for the adjustment of oxygen and carbondioxide tensions and hydrogen ion concentration in tissue cultures planted in carrell flasks. Arch. exp. Zellforsch. 16: 116 (1934)

2. Lépine, P., P. Slizewicz, P. Daniel et M. Paccaud: Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés. Ann. Inst. Pasteur 90: 654 (1956)

3. Schmidt, N.J. and E.H. Lennette: A complement fixation test for poliomyelitis. J. Exp. Med. 102: 133 (1955)

4. Mayer, M.M., A.G. Osler, O.G. Bier and M. Heidelberger: The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. J. Exp. Med. 84: 535 (1946)

5. Fulton, F. and K.R. Dumbell: The serological comparison of strains of influenza virus. J. Gen. Microbiol. 3: 97 (1949)

6. Wigand, R.: Erfahrungen mit der Mikromethode der Komplementbindungsreaktion. Z. Hyg. 143: 188 (1956)

7. Reed, L.J. and H. Muench: A simple method of estimating fifty percent end points. Am. J. Hyg. 27: 493 (1938)

8. Schmidt, W.A.K.: Die Simultan-Entsalzung. Arch. ges. Virusforsch. 14: 139 (1963)

9. Schmidt, W.A.K.: Zwei neue Methoden zur Konzentrierung und Reinigung von Polioviren. Arch. ges. Virusforsch. 12: 455 (1962)

10. Schmidt, W.A.K.: Untersuchungen über die fraktionierte Fällbarkeit der Polio-Antigenbestandteile mit Polyphos-

phorsäure.
Arch. ges. Virusforsch. 14: 508 (1964)

11. Abel, H. und W.A.K. Schmidt: Über die Fällbarkeit von Enterovirusantigenen mit Polyanionen.
Arch. ges. Virusforsch. 30: 93 (1970)

12. Albano, A.: Über einige einfache Methoden zur Konzentration von Viren.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 181: 451 (1961)

13. Hoyer, B.H., E.T. Bolton, R.A. Ormsbee, G. le Bouvier, D.B. Ritter and C.L. Larson: Mammalian viruses and rickettsiae.
Science 127: 859 (1958)

14. Schmidt, W.A.K.: Verhalten der Polio-Antigene im Ecteola-Zellulose-Ionenaustauscher.
Arch. ges. Virusforsch. 13: 368 (1963)

15. Giron, D.J. and A. Heliman: Purification of Poliovirus by DEAE "Sephadex A-25".
Nature 204: 263 (1964)

16. Levintow, L. and J.E. Darnell jr.: A simplified procedure for purification of large amounts of poliovirus: characterization and amino acid analysis of type 1 poliovirus.
J. Biol. Chem. 235: 70 (1960)

17. Hodes, H.L., H.D. Zepp and E. Ainbender: A physical property as a virus marker. Difference in avidity of cellulose recin for virulent (Mahoney) and attenuated (LSc, 2ab) strain of type 1 poliovirus.
Virology 11: 306 (1960)

18. Höher, P.G., U. Böhme, E. Kuwert und K.C. Lickfeld: Charakterisierung und Reinheitsprüfung eines komplementbindenden N/D-Poliovirion-Typ I-Antigens für Routinediagnostik und intratypische Serodifferenzierung.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 222: 1 (1972)

19. Tumilowicz, J.J. and K. Hummeler: Heterogeneity of apparently complete poliovirus particles. J. Bacteriol. 87: 1105 (1964)

20. Ainbender, E., H.D. Zepp and H.L. Hodes: The difference in elutability of poliovirus and SV_{40} from a DEAE column. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110: 271 (1962)

21. Vincent, P. et G. Bétail: Purification partielle d'une suspension de virus poliomyélitique en vue de l'obtention d'un antigène pour réaction de fixation du complément. Compt. Rend. Soc. Biol. 158: 2147 (1964)

22. Taylor, J. and A.F. Graham: Purification of poliovirus labeled with radiophosphorus. Virology 6: 488 (1958)

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. P. Naumann danke ich für die Gewährung eines Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie.

Herrn Professor Dr. rer. nat. W.A.K. Schmidt sage ich herzlichen Dank für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Name:	W. Barthel Hillebrand
Geboren:	14. November 1941 in Aachen
Eltern:	Direktor der Landeshauptkasse Karl Hillebrand und Frau Magda geb. Mirbach
Konfession:	röm.-kath.
Schulbildung:	1948 - 1952 Volksschule
	1952 - 1961 Math.-Naturwissenschaftliches Max Planck-Gymnasium Düsseldorf
Studium:	1961 - 1963 Universität Münster (Chemie)
	1963 - 1965 Universität Köln mit Fakultätswechsel im Jahre 1964
	1965 - 1970 Universität Düsseldorf
Abgelegte Prüfungen:	
	1967 Physikum mit der Gesamtnote Sehr Gut
	1970 Staatsexamen mit der Gesamtnote Sehr Gut
MA-Zeit:	1970 - 1971 Innere Abteilung sowie Chirurgische Abteilung des St. Martinus-Krankenhauses in Düsseldorf
	1971 - 1971 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf
Ärztliche Tätigkeit:	
	1971 - 1975 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf
	1975 Eintritt in die Kinderklinik des Krankenhauses Düsseldorf-Gerresheim